

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.01.005

Peroxiredoxin 2 基因 RNAi 慢病毒载体构建 及对 SW480 细胞增殖的影响*

冯继红¹,傅仲学^{1△},文坤明²,卢伟东¹,王昊¹,陈旺盛³,郭金宝¹,张寿儒¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院胃肠外科 400016; 2. 遵义医学院附属医院胃肠外科, 贵州遵义 563003;
3. 泸州医学院附属医院胃肠外科, 四川泸州 646000)

摘要:目的 构建 *Peroxiredoxin 2* (PRDX2) 基因 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 慢病毒表达载体, 探讨 PRDX2 基因干扰后对结直肠癌 SW480 细胞增殖的影响。方法 设计、合成靶向 PRDX2 的 RNA 干扰的序列, 构建 pGC-EGFP-shPRDX2 慢病毒载体并进行鉴定, 同时应用 qRT-PCR 和 Western blot 方法观察转染的 SW480 结肠癌细胞 PRDX2 mRNA 和蛋白表达的抑制效果, 并通过 MTT、平板克隆形成实验检测细胞增殖变化。结果 成功构建 PRDX2 基因慢病毒载体并经测序证实; pGC-EGFP-shPRDX2 可有效抑制结直肠癌 SW480 细胞 PRDX2 的表达, 感染慢病毒的 SW480 细胞中 PRDX2 mRNA 和蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$); SW480 细胞经 PRDX2 RNA 干扰后其生长和增殖能力显著降低 ($P < 0.05$)。结论 PRDX2 基因 RNAi 慢病毒表达载体在 SW480 细胞中表达稳定可靠, PRDX2 基因干扰后有效抑制了结直肠癌 SW480 细胞的增殖和生长, 为进一步探讨 PRDX2 在结直肠癌发生、发展及转移中的作用奠定基础。

关键词: 结直肠肿瘤; 基因表达; 绿色荧光蛋白质类; 过氧化还原蛋白 2; 慢病毒载体

中图分类号: R735.3 文献标识码: A 文章编号: 1671-8348(2015)01-0014-04

Construction of lentiviral vector of peroxiredoxin 2 gene mediating RNAi and its effects on the proliferation of SW480 cell*

Feng Jihong¹, Fu Zhongxue^{1△}, Wen Kunming², Lu Weidong¹, Wang Hao¹, Chen Wangsheng³, Guo Jinbao¹, Zhang Shouru¹

(1. Department of Gastroenterological Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Department of gastroenterological Surgery, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China; 3. Department of Gastroenterological Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To construct a lentiviral expression vector of *peroxiredoxin 2* (PRDX2) RNA interference (RNAi) and to investigate the effect of siRNA of PRDX2 genes on the proliferation of human colonrectal cancer SW480 cell. Methods RNAi target sequences were designed and synthesized towards the PRDX2 gene sequences. The lentiviral vector pGC-EGFP-shPRDX2 was constructed and identified. The vector was transformed into SW480 cells, and the transfection efficiency was evaluated by fluorescence microscopy. The expression of PRDX2 was detected with Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot in the transfected cells. Cell growth and colony forming ability were detected with MTT and plate cloning technique. Results PRDX2 gene lentiviral vector was successfully established and was proved by gene sequencing. The expression of PRDX2 in mRNA and protein was significantly reduced ($P < 0.05$). The PRDX2 mRNA and protein expression in SW480 transfected with lentiviral were significantly reduced ($P < 0.05$), and the ability of growth and proliferation were significantly reduced ($P < 0.05$). Conclusion PRDX2 gene lentiviral vector could be a stable and reliable tool. The proliferation and growth of SW480 cells transfected by pGC-EGFP-shPRDX2 could be effectively suppressed, which could facilitate further investigation of the roles of PRDX2 gene in the development and progression of colorectal cancer.

Key words: colorectal neoplasms; gene expression; green fluorescent proteins; peroxiredoxin 2 (PRDX2); lentivirus vector

结直肠癌 (colorectal carcinoma, CRC) 是消化系统常见恶性肿瘤之一。全球范围内, 结直肠癌分别位居男、女性恶性肿瘤的第 3、4 位, 导致每年 61 万人死亡^[1-2]。在中国, 近年结直肠癌发病率逐年上升, 且发病年龄明显提前, 每年约有 40 万新发病例, 现在我国消化系统恶性肿瘤中列第 2 位^[3]。

随着肿瘤的快速生长, 肿瘤组织内常常会出现局限性缺氧灶, 并且这些缺氧灶随着肿瘤内血管的生长而变化。低氧导致了活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生, 细胞保护系统可破坏 ROS 并修复其造成的损害。过氧化还原蛋白 2 (peroxiredoxin 2, PRDX2) 是一种新近发现的相对分子质量在 20~

30×10^3 的过氧化物酶家族 (peroxiredoxins, PRDXs) 成员之一, 可通过其过氧化物酶等功能或以分子伴随物形式在肿瘤细胞对抗 ROS、放化疗抵抗、细胞增殖、分化、凋亡及肿瘤血管形成等过程中发挥重要作用。前期实验结果证实 PRDX2 基因在结直肠癌中表达上调, 且与结直肠癌的发生、发展有密切关系^[4]。本实验通过构建 PRDX2 基因的慢病毒表达载体, 制备高滴度慢病毒颗粒并感染结直肠癌 SW480 细胞株, 检测 PRDX2 在 mRNA 和蛋白质水平的表达情况, 同时观察感染慢病毒的 SW480 细胞株其生长和增殖情况, 为进一步探讨 PRDX2 基因对结直肠癌 SW480 细胞生物学行为的影响及其

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81172295)。 作者简介: 冯继红 (1977-), 副教授, 博士, 主要从事肿瘤干细胞和肿瘤免疫研究, 现单位变更为遵义医学院附属医院肿瘤医院。 △ 通讯作者, Tel: (023) 67706399; E-mail: fzx990521@sina.com。

分子作用机制奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与试剂 人结直肠癌细胞株 SW480 细胞株购自中国科学院上海细胞库, HpaI 和 XhoI 酶切、增强剂 *Eni. S*、polybrene 购自上海吉凯基因化学技术有限公司, Lipofectamine 2000 购于 Invitrogen 公司, QIAGEN Plasmid 大抽 Kit 购自 QIAGEN, T4 DNA ligase 购自 NEB 公司, Taq DNA polymerase、dNTP Mix、DNA Ladder 购自 Fermentas 公司, PrimeStar™ HS DNA Polymerase 购自 Takara 公司, 胎牛血清 (FBS)、牛血清蛋白 (BSA) 购自上海微科生化试剂有限公司, DMEM、Leibovitz's L-15 培养基购自 GIBCO 公司, 蛋白裂解液 RIPA 和蛋白酶抑制剂 PMSF 均购自于上海生物试剂厂, 胰酶购自上海化学试剂公司, BCA 蛋白含量试剂盒购于南京凯基生物公司, PRDX2 一抗购自美国 Abcam 公司, GAPDH、GFP 抗体和 HRP 标记鼠二抗均购于 Santa Cruz 公司。

1.1.2 RNAi 重组慢病毒载体 据 GeneBank PRDX2 基因转录本 (NM_005809.4) 设计 5 个针对 PRDX2 基因的 siRNA 序列和阴性对照 (negative control) siRNA, 构建的目的慢病毒载体命名为 pGC-EGFP-shPRDX2, 由上海吉凯基因化学技术有限公司构建和包装。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增及产物鉴定 针对目的基因序列, 据 RNA 干扰序列设计原则, 设计多个 RNA 干扰靶点序列, 选择最佳的动力学参数靶点进入后续实验流程; 同时设计 RNAi 阴性对照 Scramble 序列 (5'-TTC TCC GAA CGT GTC ACG T-3')。针对靶点设计 5 条 shRNA, 分别命名为: PRDX2-RNAi (8818-2)、PRDX2-RNAi (8819-1)、PRDX2-RNAi (8820-1)、PRDX2-RNAi (8821-1)、PRDX2-RNAi (8822-1), 见表 1。PCR 反应条件为: 94 °C 30 s; 94 °C 30 s; 55 °C 50 s; 72 °C 30 s; 72 °C 6 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物进行纯化回收后, 经双酶切后的 pGC-EGFP 载体连接产生 shRNA 慢病毒载体; 对酶切片段进行回收、连接, 然后转化大肠杆菌感受态细胞。挑取单菌落鉴定, 引物是: 上游 5'-TTC TAC CCT CTG GAC TTC ACT-3'; 下游 5'-GCA ATG CCC TCA TCT GTT-3', 产物大小: 251 bp。反应条件: 94 °C 30 s; 94 °C 30 s; 60 °C 30 s; 72 °C 30 s; 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。设立阴性对照组 (空载质粒为模板) 和阳性对照组 (插入 GAPDH 片段的载体组), 对假阳性和假阴性结果进行排除。对 PCR 阳性克隆片段测序, 并在 GenBank 数据库中将测序出的结果进行 Blast 比对。

1.2.2 慢病毒的包装与病毒滴度测定 293 T 细胞用含 100 mL/L FBS 的 DMEM 培养基, 于 37 °C、50 mL/L CO₂ 孵箱中培养。5 个重组慢病毒质粒和空慢病毒载体分别与辅助包装载体质粒, 用 Lipofectamine™ 2000 共转染 293T 细胞, 具体方法参考试剂说明书进行操作。48 h 后在荧光显微镜下观察到细胞绿色荧光的产生, 收集上清液, 20 000 r/min 超速离心 3 h 并浓缩病毒。最后包装产生的慢病毒有两种, 即含有 PRDX2 基因序列的慢病毒 pGC-EGFP-shPRDX2 和空载对照慢病毒 pGC-EGFP-NC。逐孔稀释滴度测定法和 PCR 测定其病毒滴度 (TU/mL)。获得 PRDX2 siRNA 慢病毒溶液 (5 个干扰序列慢病毒液分别以设计的 PRDX2 干扰序列编码命名) 及空载对照慢病毒 pGC-EGFP-NC, 病毒液分装后于 -70 °C 保存。

1.2.3 病毒感染 SW480 细胞并检测其干扰效果 将 SW480

细胞计数并均匀平铺于 6 孔板, 使其感染时细胞汇合率达 60% 左右, 按照种植的 SW480 细胞数及 MIO 值 (MIO=50) 计算所加的病毒量, 病毒原液用增强剂 *Eni. S* 稀释, 使其浓度为标准浓度 (1×10^8), 依次加入终浓度为 8 μg/mL Polybrene、*Eni. S*、L-15 培养基及计算的标准浓度病毒液, 总体积为 1 mL。将含有 PRDX2 基因片段的慢病毒 pGC-EGFP-shPRDX2 与 pGC-EGFP-NC 分别感染 SW480 细胞。感染后的 SW480 细胞根据感染的病毒命名分组为 pGC-EGFP-shPRDX2 组、pGC-EGFP-NC 组, 同时将未感染的 SW480 细胞作为空白对照组。各组细胞常规培养 24 h 后更换为含有 3 μg/mL 嘌呤霉素 (Puromycin) 的 L-15 培养液进行抗性筛选, 感染至 3 d 后行荧光显微镜下观察绿色荧光, 在药物选择压力下培养 4 d 后收获细胞进行检测。

1.2.4 Western blot 法检测 将 pGC-EGFP-shPRDX2 和 pGC-EGFP-NC 成功转染至 SW480 细胞, 经荧光显微镜观察, 转染效率达 95% 以上。细胞分组如下: 将 GAPDH 作为阳性对照组、空载对照慢病毒 (pGC-EGFP-NC) 以及由 5 个针对 PRDX2 基因的序列的 RNAi 慢病毒载体质粒细胞组。收集各组细胞, PBS 洗涤 2 次, 离心弃上清液, 加入 100 μL 预冷的 RIPA 细胞裂解液, 置冰上 30 min, 4 °C、12 000 g 离心 15 min, 取上清液并进行蛋白定量 (BCA) 法。取 30 μg 蛋白加入上样缓冲液, 经 100 °C、10 min 变性后用 100 g/L 的十二烷基-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离。蛋白半干转移至 PVDF 膜, 用含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液室温封闭 1 h, 加入小鼠抗人 PRDX2 的一抗或小鼠抗人 GAPDH 的一抗, 4 °C 过夜, TBST 溶液再次洗涤 3 次, 加入 HRP 标记的山羊抗小鼠二抗 37 °C 孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 化学发光 (electrochemiluminescence, ECL) 观察, 将胶片拍照后用凝胶图像处理系统分析, 实验重复 3 次。

表 1 化学合成的目的基因 PRDX2 的 5 条干扰序列

序号	Target 序列信息	GC 含量 (%)	Start Pos.
PRDX2-RNAi(8818-2)	CTGGCAGTGA-CACGATTAA	47.37	681
PRDX2-RNAi(8819-1)	TTCGCCAGAT-CACTGTAA	42.11	561
PRDX2-RNAi(8820-1)	GACGCTTGCT-GAGGATTA	47.37	474
PRDX2-RNAi(8821-1)	GAAGCTGTCG-GACTACAAA	47.37	232
PRDX2-RNAi(8822-1)	TCTTTATCATC-GATGGCAA	36.84	534

1.2.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 采用 qRT-PCR 技术检测慢病毒转染后的 SW480 细胞中 PRDX2 mRNA 水平表达。Trizol 抽提细胞 RNA, 采用 Oligo(dT) 引物和随机引物进行逆转录, 以各组细胞 cDNA 作为模板, 每个组设立 3 个复孔进行 qRT-PCR 检测。GAPDH 上游引物为: 5'-TGA CTT CAA CAG CGA CAC CCA-3', 下游引物为: 5'-CAC CCT GTT GCT GTA GCC AAA-3', 引物序列长度 225 bp; PRDX2 基因上、下游引物为 5'-CGG ACT ACA AAG GGA AGT ACG TG-3', 下游引物为 5'-CCA GGT GGG TGA ACT GAG AGT C-3', 引物序列长度 162 bp。PCR 的反应条件: 95 °C 2 min; 95 °C 20 s; 60 °C 30 s; 72 °C 30 s (40 个循环), 反应完成后, 得出 Ct 值, 2^{-ΔΔCT} 法计算出相对表达量, 分析各组之间 PRDX2

基因的 mRNA 相对表达的差异。

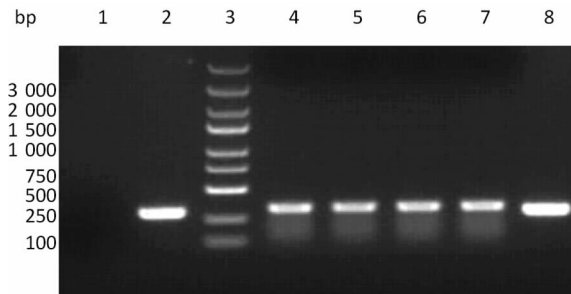
1.2.6 四唑盐(MTT)法测定细胞相对抑制率 取状态良好,处于对数生长期各组细胞,0.25%胰酶消化后制成单细胞悬液,调整浓度为 1×10^4 个/mL,均匀接种于 96 孔板内,每孔加 200 μ L L-15 培养基;阴性对照组与空白对照组,每组设 6 个复孔,常规培养,每 2 天换 1 次液,连测 7 d;每天固定时间向每孔加新鲜配制的 5 g/L 的 MTT 10 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h;轻洗去上清液后每孔加 DMSO 150 μ L,水平震荡混匀,酶标仪于 490 nm 波长处测吸光度(A)值,取 6 孔平均值,绘制生长曲线。

1.2.7 平板克隆形成实验 取 pGC-EGFP-NC 组及 pGC-EGFP-shPRDX2 组的 SW480 细胞消化后平铺于 6 孔板中,常规培养,2~3 d 更换 1 次新鲜培养基,待细胞生长出肉眼观察可见有明显克隆群落时取出结晶紫染色,拍照并计算细胞克隆生长群落。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

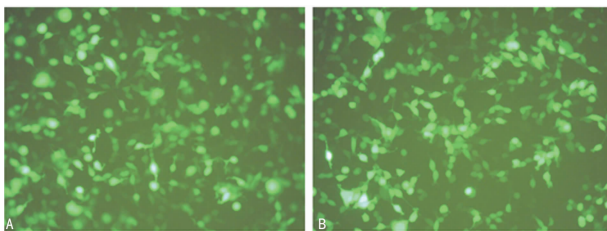
2.1 慢病毒表达载体 pGC-EGFP-shPRDX2 的构建与酶切鉴定 以 PRDX2 基因全长克隆为模板,扩增出 PRDX2 基因编码框的序列,用 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,PRDX2 基因产物纯化后与载体 pGC-EGFP 行酶切、连接、转化,并得到数十个克隆,挑取 5 个克隆,摇菌后进行菌液鉴定,结果表明可扩增出约 340 bp 的目的片段(图 1)。经测序鉴定与 GenBank NM_005809.4 序列一致,重组载体 pGC-EGFP-shPRDX2 构建成功。



1: ddH₂O; 2: pGC-EGFP; 3: marker; 4~8: pGC-1, 2, 3, 4, 5。

图 1 阳性克隆 PCR 鉴定

2.2 慢病毒的包装与病毒滴度的测定 慢病毒载体共转染 293T 细胞,于转染 48 h 后在荧光显微镜下观察其 293T 细胞发出的绿色荧光(图 2)。经测定,慢病毒 pGC-EGFP-shPRDX2 浓缩后的病毒滴度大约为 2×10^9 TU/mL, pGC-EGFP-NC 浓缩后的病毒滴度则为 2×10^8 TU/mL。

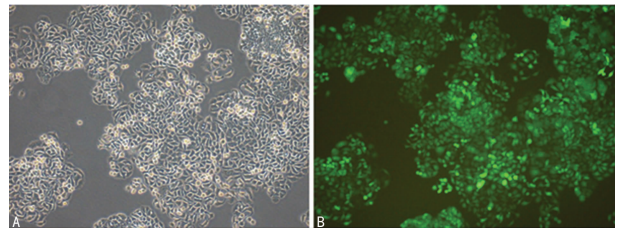


A: pGC-EGFP-shPRDX2; B: pGC-EGFP-NC。

图 2 293 T 细胞病毒感染后荧光显微镜观察($\times 200$)

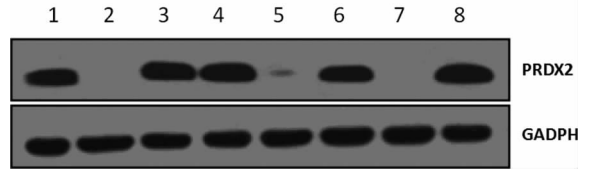
2.3 慢病毒转染 SW480 细胞后荧光表达检测 SW480 细胞感染 pGC-EGFP-shPRDX2 72 h 后在荧光显微镜下观察其绿色荧光表达,从明视野和荧光视野二者比较中,可见其感染效

率较高,可达 95% 以上,见图 3。



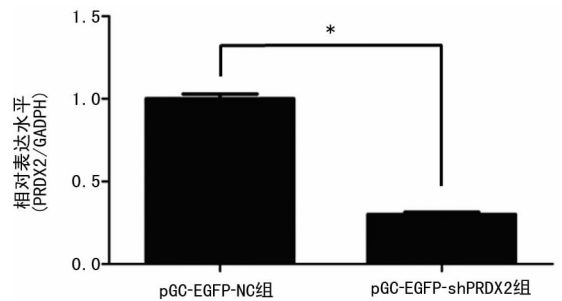
A: 明视野; B: 荧光视野。

图 3 转染 SW480 细胞 72 h 荧光表达检测($\times 200$)



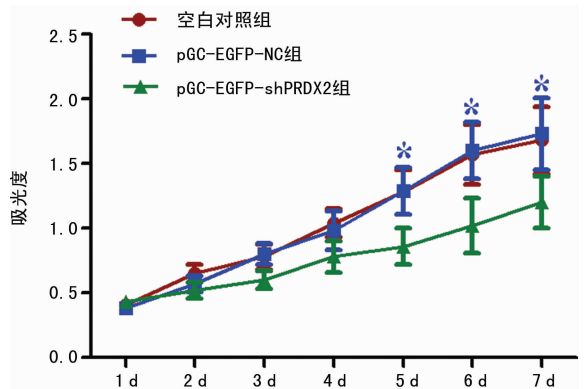
1: 阳性对照组; 2: 空白细胞组; 3: pGC-EGFP-NC 组; 4~8: 含有针对 PRDX2 基因的不同干扰序列的 RNAi 慢病毒载体质粒细胞组(5、7 表示有明显敲减效果)。

图 4 Western blot 法检测感染后 SW480 细胞中 PRDX2 的蛋白水平



*: $P < 0.05$, 与 pGC-EGFP-NC 组比较。

图 5 PRDX2 基因沉默在 SW480 细胞中的 PRDX2 mRNA 表达



*: $P < 0.05$, 与空白对照组及 pGC-EGFP-NC 组比较。

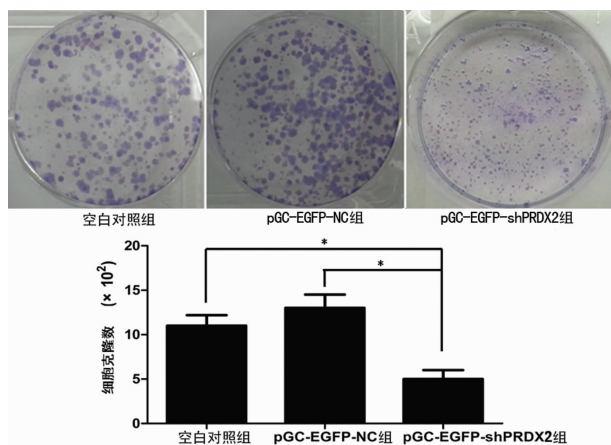
图 6 MTT 检测 PRDX2 RNAi 对 SW480 细胞增殖抑制作用

2.4 Western blot 和 qRT-PCR 检测分析 检测转染不同序列 pGC-EGFP-shPRDX2 慢病毒的 SW480 细胞中 PRDX2 蛋白表达水平,与 pGC-EGFP-NC 组相比, RNAi 慢病毒载体质粒细胞组中 5 和 7 泳道表示对 SW480 细胞中 PRDX2 表达有明显敲减作用,其中 7 泳道 PRDX2-RNAi(8822-1)的敲减效果最强,达到几乎完全抑制效果(图 4)。qRT-PCR 检测 PRDX2 基因的 mRNA 相对表达水平,与 pGC-EGFP-NC 组比较, pGC-EGFP-shPRDX2 组的 PRDX2 基因表达明显降低,差异有统

计学意义($P < 0.05$),可说明在 mRNA 水平基因敲减有效,见图 5。

2.5 MTT 法检测 MTT 法检测各组 SW480 细胞 6 d OD 值,绘制生长曲线,结果显示,与 pGC-EGFP-NC 组及空白对照组相比,SW480 pGC-EGFP-shPRDX2 组细胞增殖能力受到显著抑制,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图 6。

2.6 平板克隆形成实验 细胞平板克隆形成实验结果(图 7)显示,与 pGC-EGFP-NC 组及空白对照组比较,pGC-EGFP-shPRDX2 组的平板克隆形成能力明显降低($P < 0.05$)。



*: $P < 0.05$,与空白对照组及 pGC-EGFP-NC 组比较。

图 7 pGC-EGFP-shPRDX2 对 SW480 细胞平板克隆形成能力的影响

3 讨论

生命有机体在不断进化和演变过程中,逐渐形成能够有效清除 ROS 产生的自由基等有害物质的细胞保护性防御系统,过氧化物酶类、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶以及谷胱甘肽共同组成了细胞防御系统。PRDXs 家族在细胞内发挥重要的抗氧化保护功能,通过过氧化物酶活性,可减少或清除过氧化氢、过氧亚硝酸盐和一系列有机氢过氧化物(ROOH),该家族包括 6 个成员,广泛存在于真核及原核生物中。PRDX2 属于 PRDXs 家族 2-Cys PRDXs(PRDX 1~5)成员,是机体氧化代谢的重要酶之一,主要分布于细胞质^[5]。PRDX2 最主要的生物学功能是抗氧化,同时可通过调节细胞内 H_2O_2 浓度,参与 H_2O_2 介导的信号转导途径^[6]。PRDX2 以硫氧还蛋白为电子供体,清除活性氧簇,与生物的生长发育、细胞衰老、免疫抑制密切相关,并在维持红细胞生存,促进 NK 细胞发挥自然杀伤功能的过程中扮演重要角色^[7-8]。

近年来,随着研究的不断深入,PRDX2 与肿瘤的关联机制逐渐被揭示,PRDX2 不仅通过发挥抗氧化、分子伴侣、信号调节等功能维持细胞内的稳态,还通过多种信号转导途径参与肿瘤的发生、发展、转移、血管生成以及放疗抵抗^[9-13]。有研究报道,PRDX2 可抑制 DNA 损伤诱导的肿瘤细胞死亡,更重要的是,这种保护性作用仅限于在肿瘤细胞内,且并非是通过过氧化物酶活性发挥作用的^[14]。既往研究表明,在乳腺癌、肝癌、骨肉瘤及前列腺癌中 PRDX2 高表达,被认为是促癌因子,但在急性粒性白血病^[15]、膀胱癌、黑色素瘤中表达降低,又被认为是抑癌因子。那么 PRDX2 在肿瘤细胞中究竟发挥什么角色?是发挥抗癌作用还是抑癌作用?这些争议仍有待探索。至今,PRDX2 在结直肠癌中的作用尚未有明确报道,本研究前期实验研究也初步证实 PRDX2 在结直肠癌组织及细胞株中表达上调,且与结直肠癌的发生、发展、转移和预后有关。根据

本实验结果,观察到转染 pGC-EGFP-shPRDX2 建立的稳定 SW480 细胞株其形态学发生了变化,不仅增殖和生长能力减弱,抗菌及抗凋亡能力也明显降低,但同时也发现细胞黏附能力和转移能力反而增强,这些生物学功能的变化虽仍需进一步验证,但亦可为下一步的研究提供一种思路,PRDX2 在结直肠癌中是否可能发挥更为关键的作用,是否存在双向调控作用尚需证实,其具体分子调控机制也有待深入探讨。

本实验设计的针对 PRDX2 的特异性 RNA 干扰序列,将干扰序列定向克隆转接并感染目的细胞。为了验证 PRDX2 基因的 siRNA 重组体构建成功,本研究采用 PCR 鉴定和 DNA 测序鉴定构建的 PRDX2 基因 siRNA 慢病毒载体,证实了插入片段的序列正确,重组体构建成功。将 5 种构建的干扰重组体转染 293T 细胞,包装产生了高滴度的病毒颗粒,通过直接感染目的细胞,可有效避免感染目的细胞株出现的脱靶现象。实验得到的 PRDX2 RNAi SW480 细胞株,通过初步的功能学实验,证实了 PRDX2 基因敲减后可有效抑制结直肠癌 SW480 细胞的增殖和生长,这些初步研究结果为探讨 PRDX2 基因敲减后 SW480 细胞的成瘤特性、细胞周期变化及对抗肿瘤药物的敏感性等方面提供研究支撑,同时也为探讨 PRDX2 基因在结直肠癌中的具体调控作用及分子作用机制奠定研究基础。

参考文献:

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer Statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1):10-29.
- [2] American Cancer Society. Colorectal cancer facts & figures [M]. Atlanta: ACS, 2011-2013.
- [3] 王锡山. 结直肠癌综合治疗的规范化实施[J]. 中国实用外科杂志, 2010, 30(4):260-264.
- [4] Wu XY, Fu ZX, Wang XH. Peroxiredoxins in colorectal neoplasms[J]. Histo Histopathol, 2010, 25(10):1297-1303.
- [5] Wood ZA, Schröder E, Robin Harris J, et al. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins[J]. Trends Biochem Sci, 2003, 28(1):32-40.
- [6] Rhee SG, Kang SW, Jeong W, et al. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins[J]. Curr Opin Cell Biol, 2005, 17(2):183-189.
- [7] Ishii T, Warabi E, Yanagawa T. Novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer and innate immunity[J]. J Clin Biochem Nutr, 2012, 50(2):91-105.
- [8] Godoy JR, Funke M, Ackermann W, et al. Redox atlas of the mouse. Immunohistochemical detection of glutaredoxin-, peroxiredoxin-, and thioredoxin-family proteins in various tissues of the laboratory mouse[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1810(1):2-92.
- [9] Han YH, Kwon JH, Yu DY, et al. Inhibitory effect of peroxiredoxin II (Prx II) on Ras-ERK-NFkappaB pathway in mouse embryonic fibroblast(MEF) senescence[J]. Free Radic Res, 2006, 40(11):1182-1189.
- [10] Kang DH, Lee DJ, Lee KW, et al. Peroxiredoxin II is an essential antioxidant enzyme that prevents the oxidative inactivation of VEGF receptor-2 in vascular(下转第 20 页)

计学意义($P>0.05$),这表明不同专项运动员 ACE 基因 I/D 多态分布不同。上述研究显示不同专项运动员 ACE 基因 I/D 多态分布不同,速度力量项目运动运动员 D 等位基因出现频率较高,这提示 ACE 基因 I/D 多态可作为专项运动员基因选材的遗传标记。本研究也证实了这一特点,速度力量型的跳远运动员 D 等位基因明显高于对照组,提示 D 等位基因可作为速度力量型专项运动遗传选材的分子标记。

综上所述,ACE 基因 I/D 多态性可能与跳远运动员运动能力相关,ACE DD 基因型和 D 等位基因可作为跳远运动员遗传选材的分子标记。目前,ACE 基因影响运动能力的机制并不十分清楚,进一步分析 ACE 基因 I/D 多态与肌纤维类型、线粒体密度及活性等关系有利于从更深的水平上认识 ACE 基因与运动能力关系。

参考文献:

- [1] Tucker R, Santos-Concejero J, Collins M. The genetic basis for elite running performance[J]. *Br J Sports Med*, 2013, 47(9): 545-549.
- [2] Ma F, Yang Y, Li X, et al. The association of sport performance with ACE and ACTN3 genetic polymorphisms: a systematic review and meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54685.
- [3] Rasyid H, Bakri S, Yusuf I. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms, blood pressure and pulse pressure in subjects with essential hypertension in a South Sulawesi Indonesian population[J]. *Acta Med Indones*, 2012, 44(4): 280-283.
- [4] Eynon N, Hanson ED, Lucia A, et al. Genes for elite power and sprint performance: ACTN3 leads the way[J]. *Sports Med*, 2013, 43(9): 803-817.
- [5] Tucker R, Collins M. What makes champions? A review of the relative contribution of genes and training to sporting success[J]. *Br J Sports Med*, 2012, 46(8): 555-561.
- [6] Allison SJ. Hypertension: Role of renal ACE in response to hypertensive stimuli[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2013, 9(7): 372.
- [7] Pereira A, Costa AM, Izquierdo M, et al. ACE I/D and ACTN3 R/X polymorphisms as potential factors in modulating exercise-related phenotypes in older women in response to a muscle power training stimuli[J]. *Age (Dordr)*, 2012, 35(5): 1949-1959.
- [8] Di Cagno A, Sapere N, Piazza M, et al. ACE and AGTR1 polymorphisms in elite rhythmic gymnastics[J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2013, 17(2): 99-103.
- [9] Soubrier F. From an ACE polymorphism to genome-wide searches for eQTL[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(1): 111-112.
- [10] Cieszczyk P, Krupecki K, Maciejewska A, et al. The angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism in Polish rowers[J]. *Int J Sports Med*, 2009, 30(8): 624-627.
- [11] Papadimitriou ID, Papadopoulou C, Kouvatsi A, et al. The ACE I/D polymorphism in elite Greek track and field athletes[J]. *J Sports Med Phys Fitness*, 2009, 49(4): 459-463.
- [12] Costa AM, Silva AJ, Garrido ND, et al. Association between ACE D allele and elite short distance swimming[J]. *Eur J Appl Physiol*, 2009, 106(6): 785-790.
- [13] 席翼, 张秀丽, 胡杨, 等. 中国优秀马拉松运动员 ACE 基因 I/D 多态性频率分布特[J]. *中国运动医学杂志*, 2006, 25(4): 391-393.
- [14] 高炳宏, 陈佩杰, 董强刚, 等. 上海地区汉族优秀游泳运动员 ACE 基因 I/D 多态性研究[J]. *中国运动医学杂志*, 2006, 25(5): 517-521.
- [15] 余黎霞, 宋磊刚. 武术散打运动员 ACE 基因 I/D 多态性研究[J]. *现代预防医学*, 2010, 37(5): 893-896, 899.
- [16] 孙小敏, 甄文娟, 王煜, 等. 运动员血管紧张素转换酶基因插入或缺失多态性研究[J]. *中国运动医学杂志*, 2004, 23(5): 546-547.

(收稿日期:2014-09-15 修回日期:2014-10-19)

(上接第 17 页)

- endothelial cells[J]. *Molecular Cell*, 2011, 44(4): 545-558.
- [11] Choi MH, Lee IK, Kim GW, et al. Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II[J]. *Nature*, 2005, 435(7040): 347-353.
- [12] Zhang B, Wang Y, Su Y. Peroxiredoxins, a novel target in cancer radiotherapy[J]. *Cancer Lett*, 2009, 286(2): 154-160.
- [13] Shiota M, Yokomizo A, Kashiwagi E, et al. Peroxiredoxin 2 in the nucleus and cytoplasm distinctly regulates androgen receptor activity in prostate cancer cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(1): 78-87.
- [14] Lee KW, Lee DJ, Lee JY, et al. Peroxiredoxin II restrains DNA damage-induced death in cancer cells by positively regulating JNK-dependent DNA repair[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(10): 8394-8404.
- [15] Agrawal-Singh S, Isken F, Agelopoulos K, et al. Genome-wide analysis of histone H3 acetylation patterns in AML identifies PRDX2 as an epigenetically silenced tumor suppressor gene[J]. *Blood*, 2012, 119(10): 2346-2357.

(收稿日期:2014-09-12 修回日期:2014-10-14)